

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. November 2003 (13.11.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2003/093482 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82,
C12P 7/64

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/004297

(22) Internationales Anmeldedatum:
25. April 2003 (25.04.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 19 203.0 29. April 2002 (29.04.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; Carl-
Bosch-Str. 38, 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CIRPUS, Petra
[DE/DE]; Landteilst. 12, 68163 Mannheim (DE). RENZ,
Andreas [DE/DE]; Heinrich-von-Kleist-Str. 6, 67117 Lim-
burgerhof (DE). LERCHL, Jens [DE/SE]; Önsjövägen
17, S-26831 Svalöv (SE). KUIJPERS, Anne-Marie
[NL/DE]; Pappelstr. 31, 67166 Otterstadt (DE).

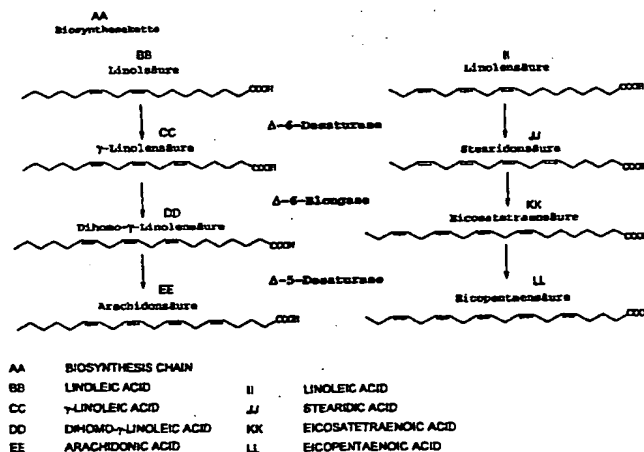
(74) Anwalt: PRESSLER, Uwe; c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING MULTIPLE UNSATURATED FATTY ACIDS IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG MEHRFACH UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN IN PFLANZEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for producing fatty acid esters which contain unsaturated fatty acids with at least three double-bonds, and free unsaturated fatty acids having a content of at least 1 wt.-%, in relation to the total amount of fatty acids contained in plants, by expression of at least one nucleic acid sequence which codes for a polypeptide having D-6-desaturase activity, and at least one nucleic acid sequence which codes for a polypeptide having D-6-elongase activity. Advantageously, said nucleic acid sequences can be expressed, optionally, together with a third nucleic acid sequence in the transgenic plant, which codes for a polypeptide having D-5-desaturase activity. The invention also relates to the use of defined nucleic acid sequences which code for polypeptides having a D-6-desaturase activity, D-6-elongase activity or D-5-desaturase activity, selected from a group of nucleic acid sequences, or to the use of nucleic acid structures containing the above-mentioned nucleic acid sequences.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Fettsäureestern, die ungesättigte Fettsäuren mit mindestens drei Doppelbindungen enthalten, sowie freien ungesättigten Fettsäuren mit einem Gehalt von mindestens 1 Gew.-% bezogen auf die gesamten in der Pflanze enthaltenen Fettsäuren

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2003/093482 A3



RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

4. November 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

durch Expression mindestens einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit D-6-Desaturaseaktivität codiert, und mindestens einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit D-6-Elongaseaktivität codiert. Vorteilhaft können diese Nukleinsäuresequenzen gegebenenfalls zusammen mit einer dritten Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit D-5-Desaturaseaktivität codiert, in der transgenen Pflanze exprimiert werden. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung definierter Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit einer D-6-Desaturaseaktivität, D-6-Elongaseaktivität oder D-5-Desaturaseaktivität codieren ausgewählt aus einer Gruppe von Nukleinsäuresequenzen bzw. die Verwendung von Nukleinsäurekonstrukten enthalten die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/04297

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 C12P7/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/59128 A (ZAEHRINGER ULRICH ; BASF AG (DE); HEINZ ERNST (DE); LERCHL JENS (DE) 16 August 2001 (2001-08-16) claims 1,5,7,8,10,16 -----	1-14
Y	SAYANOVA ET AL: "Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta-6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 94, April 1997 (1997-04), pages 4211-4216, XP002099447 ISSN: 0027-8424 the whole document ----- -/--	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 July 2003

Date of mailing of the international search report

13.09.04

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schwachtgen, J-L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/04297

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALONSO D L ET AL: "Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids" BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 18, no. 6, October 2000 (2000-10), pages 481-497, XP004218725 ISSN: 0734-9750 page 492, paragraph 3 -----	1-14
A	WO 01/02591 A (BASF AG ;HEINZ ERNST (DE); GIRKE THOMAS (US); SCHEFFLER JODI (US);) 11 January 2001 (2001-01-11) page 10, line 40 - line 47 -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/04297

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-14 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/04297

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 1-14 (in part)

method of preparing compounds of formula I in transgenic plants by

- a) introducing a nucleic acid sequence Seq. Id. No. 1 that codes for a delta-6 desaturase from *Borago officinalis*,
- b) introducing a nucleic acid sequence Seq. Id. No. 3 that codes for a delta-6 elongase from *Physcomitrella patens*.

2. Claims 1-14 (in part): Inventions 2-30

as with group 1 but related respectively to the nucleic acid sequences Seq. Id. No. 1, Seq. Id. No. (7, 9), Seq. Id. No. (11, 15), Seq. Id. No. 13, Seq. Id. No. 17 or Seq. Id. No. 31 that code for a delta-6 desaturase, in combination with respectively a nucleic acid sequence Seq. Id. No. 3, Seq. Id. No. 5, Seq. Id. No. 19, Seq. Id. No. 25, Seq. Id. No. 29 that code for delta-6 elongase,

insofar as they do not involve the method specified in group 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/04297

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0159128	A	16-08-2001	DE 10005973 A1	16-08-2001
			DE 10023893 A1	22-11-2001
			DE 10063387 A1	12-09-2002
			AU 3924401 A	20-08-2001
			BR 0108198 A	25-03-2003
			CA 2399349 A1	16-08-2001
			CN 1398300 T	19-02-2003
			CZ 20022502 A3	16-10-2002
			EE 200200443 A	15-12-2003
			WO 0159128 A2	16-08-2001
			EP 1254238 A2	06-11-2002
			HU 0300081 A2	28-05-2003
			JP 2003523746 T	12-08-2003
			NO 20023757 A	08-10-2002
			US 2004111763 A1	10-06-2004
			ZA 200207199 A	08-09-2003
WO 0102591	A	11-01-2001	DE 10030976 A1	10-01-2002
			AU 6560700 A	22-01-2001
			CA 2378423 A1	11-01-2001
			WO 0102591 A1	11-01-2001
			EP 1190080 A1	27-03-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/04297

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/82 C12P7/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 01/59128 A (ZAEHRINGER ULRICH ; BASF AG (DE); HEINZ ERNST (DE); LERCHL JENS (DE) 16. August 2001 (2001-08-16) Ansprüche 1,5,7,8,10,16	1-14
Y	SAYANOVA ET AL: "Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta-6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 94, April 1997 (1997-04), Seiten 4211-4216, XP002099447 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument	1-14
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

A Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Juli 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13.09.04

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schwachtgen, J-L

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/04297

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ALONSO D L ET AL: "Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids" BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, Bd. 18, Nr. 6, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 481-497, XP004218725 ISSN: 0734-9750 Seite 492, Absatz 3	1-14
A	WO 01/02591 A (BASF AG ;HEINZ ERNST (DE); GIRKE THOMAS (US); SCHEFFLER JODI (US);) 11. Januar 2001 (2001-01-11) Seite 10, Zeile 40 - Zeile 47	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/04297

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____

2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____

3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____

4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-14 (partiell)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-14 (partiell)

Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I in transgenen Pflanzen mittels

- a) Einbringung einer Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1, die für eine delta-6-Desaturase aus *Borago officinalis* kodiert
- b) Einbringung einer Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, die für eine delta-6-Elongase aus *Physcomitrella patens* kodiert

2. Ansprüche: 1-14 (partiell): Erfindungen 2-30

Wie Gruppe 1 aber bezogen jeweils auf die Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:(7, 9), SEQ ID NO:(11, 15), SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:17, oder SEQ ID NO:31, die für eine delta-6-Desaturase kodieren, in Kombination mit jeweils einer Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:29, die für eine delta-6-Elongase kodieren, sofern es sich nicht um das in der Gruppe 1 aufgeführte Verfahren handelt

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/04297

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0159128 A	16-08-2001	DE 10005973 A1	16-08-2001
		DE 10023893 A1	22-11-2001
		DE 10063387 A1	12-09-2002
		AU 3924401 A	20-08-2001
		BR 0108198 A	25-03-2003
		CA 2399349 A1	16-08-2001
		CN 1398300 T	19-02-2003
		CZ 20022502 A3	16-10-2002
		EE 200200443 A	15-12-2003
		WO 0159128 A2	16-08-2001
		EP 1254238 A2	06-11-2002
		HU 0300081 A2	28-05-2003
		JP 2003523746 T	12-08-2003
		NO 20023757 A	08-10-2002
		US 2004111763 A1	10-06-2004
		ZA 200207199 A	08-09-2003
WO 0102591 A	11-01-2001	DE 10030976 A1	10-01-2002
		AU 6560700 A	22-01-2001
		CA 2378423 A1	11-01-2001
		WO 0102591 A1	11-01-2001
		EP 1190080 A1	27-03-2002